

## ビリルビンの脳細胞毒性に対する 保護および促進作用物質の研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任：山本信二郎教授)

土 屋 寿 司 郎

(昭和53年3月20日受付)

本論文の要旨は第15回、第16回日本神経病理学会学術研究会で発表した。

クモ膜下出血、あるいは脳室に穿破した脳内出血などにみられる重篤な症状は、出血自体の場所占拠性障害の他に、二次的に発生する脳腫脹、髄液吸収障害、血管攣縮その他による脳障害に起因する。クモ膜下腔に出た血液は、通常無菌性髄膜炎を起こし<sup>1)</sup>、交通性水頭症をも引き起こす<sup>2)3)</sup>。髄液系内に出血が起ると、大部分は吸収されて静脈系にはいる<sup>4)5)</sup>が、一部の赤血球は溶血し、オキシヘモグロビンから、最終的にはビリルビン、鉄などにまで分解される<sup>6)7)</sup>。クモ膜下出血後にみられる髄液のキサントクロミーの原因には、ビリルビンの役割が最も大きく<sup>8)</sup>、またビリルビンの量が症状を左右すると主張するものもある<sup>1)</sup>。藤井<sup>9)</sup>は、頭蓋内圧を指標として、一定量の血液に含有される量の赤血球、血球 ghost、ヘモグロビン、オキシヘモグロビン、ヘミンならびにビリルビンを各々単独にクモ膜下腔に注入して、このうちビリルビンによる反応が最も著明であることを証明した。ビリルビンの細胞毒性については従来、主として核黄疸の面から研究が進められてきた<sup>10)~18)</sup>。

この研究は、ビリルビンの細胞毒性を軽減あるいは増加させる物質の作用機序を、鶏胚脳培養細胞を用いて、主として糖代謝の面から検索した。対象とした物質は、核黄疸の治療に用いられるアルブミン、呼吸系の補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、呼吸酵素のチトクロム c、細胞の代謝に必須に働らくサイクリック AMP、および核黄疸に有害として知られるサルファ剤である。

### 方 法

#### 1. 脳単層培養の作成および培養期間

コーチン種あるいは白色レグホン種の孵化後9～11日目の鶏胚10個より脳を剔出して加え、トリプシンを使用することなく、Hank + 溶液中で軽くピペティングして単細胞に分離した後、5個の培養瓶(TD瓶)に分注し、培養液を用いて単層培養を行なった。培養液は翌日、3日、5日および6日目に半量宛を交換し、7日目にビリルビン添加実験を行なった。

#### 1) 対照群の作成

培養液5mlを残し、新たに培養液30mlを加え、全量を35mlとして実験に供し、対照群とした。

#### 2) ビリルビン溶液の添加

Hsia ら<sup>19)</sup>が血清ビリルビン濃度20mg/dl以上で臨床的に核黄疸の症例が増加することを報告し、Chen ら<sup>17)</sup>はウサギで、Lucy ら<sup>20)</sup>は猿を用いて血清ビリルビン濃度20mg/dlを維持する方法で高率に核黄疸を作成した。嶋田<sup>21)</sup>はビリルビン10～50mg/dlの濃度で、鶏胚脳培養細胞に糖代謝障害を来すことを報告している。著者は嶋田の実験を参考にして、培養液に添加するビリルビン量を20mg/dlとして実験を行なった。

1/10 規定の水酸化ナトリウムに、ビリルビンが20mg/mlとなるよう溶解した。この溶液を、濃度が20mg/dl×1.16倍の溶液となるよう、培養液に添加したものを用意した。培養瓶の液5mlを残し、上記のビリルビン加培養液30mlを加えて全量を35mlとすると、培養液のビリルビン濃度は20mg/dl( $3.42 \times 10^{-4}$ モル)となる。

#### 3) ビリルビンと各種薬剤の添加

上記ビリルビン加培養液に、さらに同モル数のサルファ剤(ホモスルファミン8.0mg/dl)、アルブミン(580.5mg/dl)、NAD(22.7mg/dl)、サイクリック

Inhibiting and Exacerbating Agents for Toxicity of Bilirubin on Tissue Culture of Chick Embryo Brain. Hisaziro Tsuchiya, Department of Neurosurgery (Director: Prof. S. Yamamoto), School of Medicine, Kanazawa University.

AMP (17.4mg/dl), 1/4 量のチトクロム c (100mg/dl) を加え, それぞれ作用を検索した.

## II. 培養細胞ならびに培養液の検索

培養の方法を2群に分ち, 一つは恒温倒立位相差顕微鏡 (Nikon MD 型) を用いて細胞の変化を観察し<sup>79)</sup>, 他は恒温槽を用いて培養液の変化を検索した. 各培養液から, 検索物質の添加直後, 2 時間後, 4 時間後, 6 時間後, 8 時間後にそれぞれ 7 ml ずつ液を採取して, 溶液中のブドウ糖量, 乳酸量, 焦性ブドウ酸量, 酸素含有量, 炭酸ガス含有量, および pH を測定した. 前5者については, 実験終了後トリプシンを用いて培養細胞を培養瓶の底より剔離浮遊させて, その細胞数を計算し, 細胞  $10^5$  個についての量に換算した.

## III. 測定法

ブドウ糖, 乳酸, 焦性ブドウ酸はそれぞれ, 酵素的血糖測定法, 酵素的血中乳酸測定法, 酵素的血中焦性ブドウ酸測定法 (いずれも Boehringer・Mannheim 社製) で, 分光光度計 (日立 181 型) を用いて測定した. 酸素分圧, 炭酸ガス分圧および pH は pH・blood gas analyzer (IL 313 型) を用いて測定した.

## 結 果

### I. ビリルビン負荷の影響

図1は培養液成分の経時的変化を示す. コントロール実験では糖消費量は 2.4mg/4 時間, 3.2mg/8 時間, ビリルビン負荷では 3.0mg/4 時間, 5.4mg/8 時間であった. 乳酸産生量はコントロール実験では 2.0mg/4 時間, 2.8mg/8 時間であり, ビリルビン負荷では 3.4mg/4 時間, 4.4mg/8 時間であった. 焦性ブドウ酸値はコントロール実験では 0.33mg%/直後, 0.4mg%/4 時間, 0.73mg%/8 時間であり, ビリルビン負荷では 0.31mg%/直後, 0.42mg%/4 時間, 0.64mg%/8 時間であった. 酸素消費量はコントロール実験では 0.110ml/4 時間, 0.156ml/8 時間であり, ビリルビン負荷では 0.036ml/4 時間, 0.052ml/8 時間であった. 炭酸ガス産生量はコントロール実験では 0.126ml/4 時間, 0.256ml/8 時間であり, ビリルビン負荷では 0.104ml/4 時間, 0.164ml/8 時間であった. pH の変動はビリルビン負荷の場合に増大した.

写真1および2はコントロール実験で, 7日目に培養液を交換した直後とそれから6時間後の細胞を示

## EFFECTS OF BILIRUBIN ON GLUCOSE METABOLISM

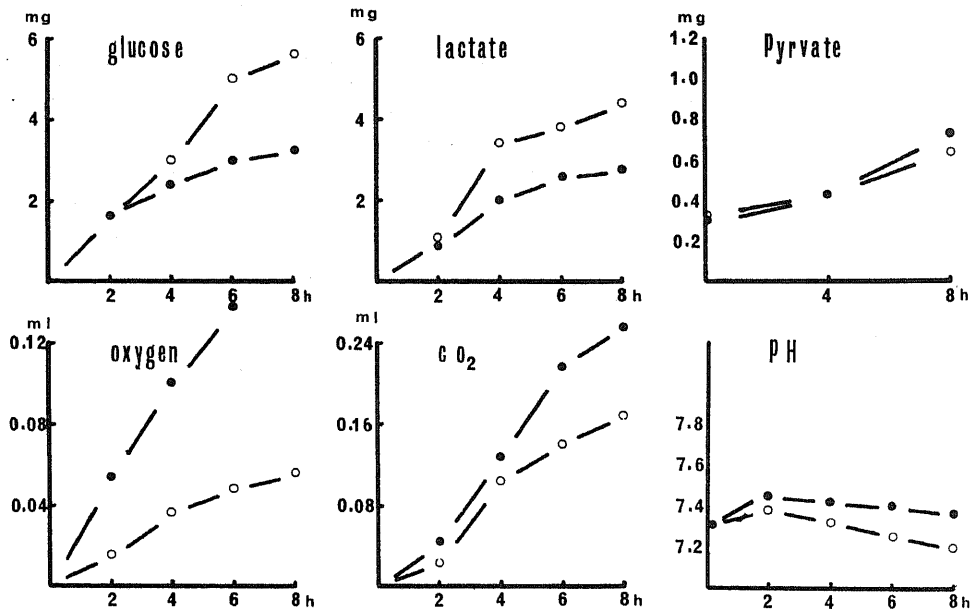


図1: ビリルビン 20mg/dl ( $3.42 \times 10^{-4}$  モル) 負荷による代謝変化

対照群に比し, 糖消費量, 乳酸産生量は増加し, 酸素消費量, 炭酸ガス産生量は減少する. 焦性ブドウ酸に著しい変化はないが, pH の変動は増大する.

○ビリルビン負荷群 ●対照群

す.個々の細胞によってその程度は異なるが培養面での移動は顕著であった.写真3および4は,ビリルビンを負荷した直後および6時間後の細胞を示す.ビリルビン負荷により細胞の動きは少なくなり,細胞質内空胞も著明となった.写真5は別の培養瓶でのビリルビン負荷6時間後の細胞を示し,著明な細胞質内空胞がみられた.

## II. 各種薬剤添加の影響

### 1) NAD

図2は培養液にビリルビン負荷および同モル数のNAD添加(22.7mg/dl)の影響を示す.糖消費量はビリルビン負荷の場合3.36mg/4時間, 4.55mg/8時間であり,NADを添加した場合3.29mg/4時間, 4.48mg/8時間であった.乳酸産生量はビリルビン単独投与の場合2.0mg/4時間, 3.0mg/8時間であり,NADを添加した場合1.33mg/4時間, 2.43mg/8時間であった.酸素消費量はビリルビン負荷の場合0.044ml/4時間, 0.060ml/8時間であり,NAD添加の場合0.060ml/4時間, 0.080ml/8時間であった.炭酸ガス産生量はビリルビン負荷の場合

0.062ml/4時間, 0.092ml/8時間であり, NADを添加した場合0.170ml/4時間, 0.248ml/8時間であった.焦性ブドウ酸量はビリルビン負荷の場合0.31mg%/直後, 0.40mg%/4時間, 0.99mg%/8時間であり, NADを添加した場合0.31mg%/直後, 0.33mg%/4時間, 0.84mg%/8時間であった. NAD添加の場合pHの変動は,ビリルビン負荷の場合よりも減少した.

写真6はNAD添加6時間後の培養細胞である.細胞質内に空胞はみられず,細胞突起の縮少もほとんどみられなかった.

### 2) チトクロムc

図3は培養液にビリルビン負荷およびチトクロムc添加の影響を示す.糖消費量はビリルビン負荷の場合3.8mg/4時間, 5.8mg/8時間であり,チトクロムc添加の場合3.6mg/4時間, 5.0mg/8時間であった.乳酸産生量はビリルビン負荷の場合2.4mg/4時間, 3.6mg/8時間であり,チトクロムc添加の場合1.10mg/4時間, 2.06mg/8時間であった.焦性ブドウ酸値はビリルビン負荷の場合0.37mg%/直後,

## EFFECTS OF NAD ON GLUCOSE METABOLISM BY BILIRUBIN

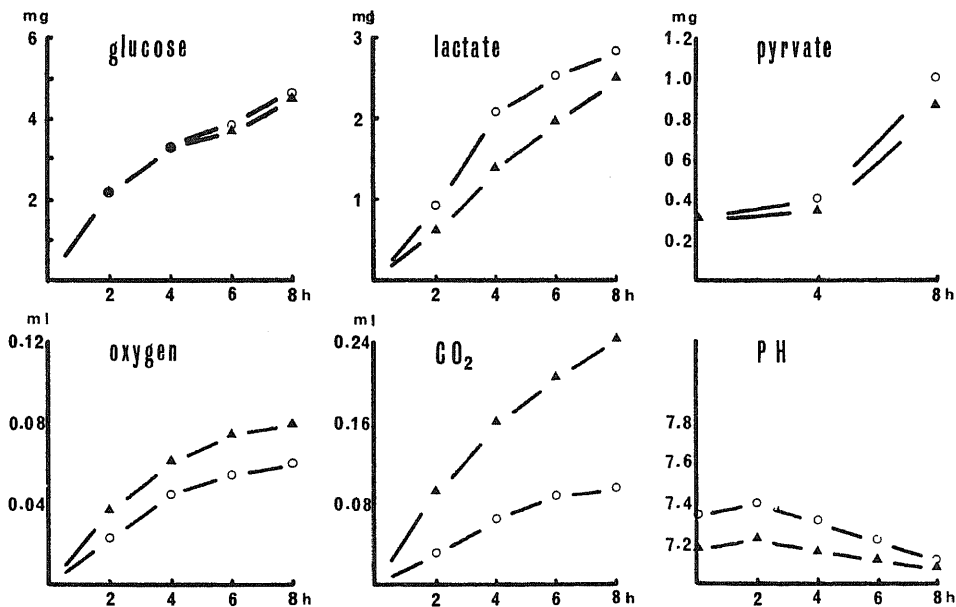


図2: NAD 22.7mg/dl ( $3.42 \times 10^{-4}$  モル) 添加による代謝変化.

ビリルビン単独負荷の場合に比し, 乳酸産生量は減少し, 酸素消費量, 炭酸ガス産生量は増加する. pHの変動は減少する.

▲ NAD 添加群 ○ビリルビン負荷群

0.54mg%/4時間, 0.83mg%/8時間であり, チトクロムc添加の場合0.31mg%/直後, 0.40mg%/4時間, 0.52mg%/8時間であった. 酸素消費量はビリルビン負荷の場合0.014 ml/4時間, 0.072 ml/8時間であり, チトクロムc添加の場合0.12 ml/4時間, 0.15 ml/8時間であった. 炭酸ガス産生量はビリルビン負荷の場合0.12 ml/4時間, 0.18 ml/8時間であり, チトクロムc添加の場合0.16 ml/4時間, 0.22 ml/8時間であった. チトクロムc添加の場合, pHの変動は, ビリルビン負荷の場合よりも減少した.

写真7はチトクロムc添加6時間後の培養細胞の写真である. 細胞質内に空泡はみられず, 細胞突起の縮小もなく, もとの形を保持していた.

### 3) アルブミン

図4は培養液にビリルビン負荷およびアルブミン添加の影響を示す. 糖消費量はビリルビン負荷の場合1.4mg/4時間, 2.3mg/8時間であり, アルブミン添加の場合2.4mg/4時間, 4.5mg/8時間であった. 乳酸産生量はビリルビン負荷の場合1.8mg/4時間, 2.8mg/8時間であり, アルブミン添加の場合

1.1mg/4時間, 1.9mg/8時間であった. 酸素消費量はビリルビン負荷の場合0.062 ml/4時間, 0.092 ml/8時間であり, アルブミン添加の場合0.061 ml/4時間, 0.096 ml/8時間であった. 炭酸ガス産生量はビリルビン負荷の場合0.071 ml/4時間, 0.177 ml/8時間であり, アルブミンを添加した場合0.123 ml/4時間, 0.232 ml/8時間であった. pHの変動はアルブミン添加の場合が, ビリルビン負荷の場合よりも減少した. アルブミン  $3.42 \times 10^{-4} \times 2$  モルでも同様の結果が得られた.

写真8はアルブミン添加6時間後の培養細胞である. 一部細胞質内に空泡はみられるが, 細胞突起の縮小は軽微であった.

### 4) サイクリック AMP

図5は培養液にビリルビン負荷およびサイクリック AMP添加の影響を示す. 糖消費量はビリルビン負荷の場合2.9mg/4時間, 4.5mg/8時間であり, サイクリック AMP添加の場合2.6mg/4時間, 3.4mg/8時間であった. 乳酸産生量はビリルビン負荷の場合2.4mg/4時間, 3.8mg/8時間であり, サイクリック

## EFFECTS OF CYTOCHROME-C ON GLUCOSE METABOLISM BY BILIRUBIN

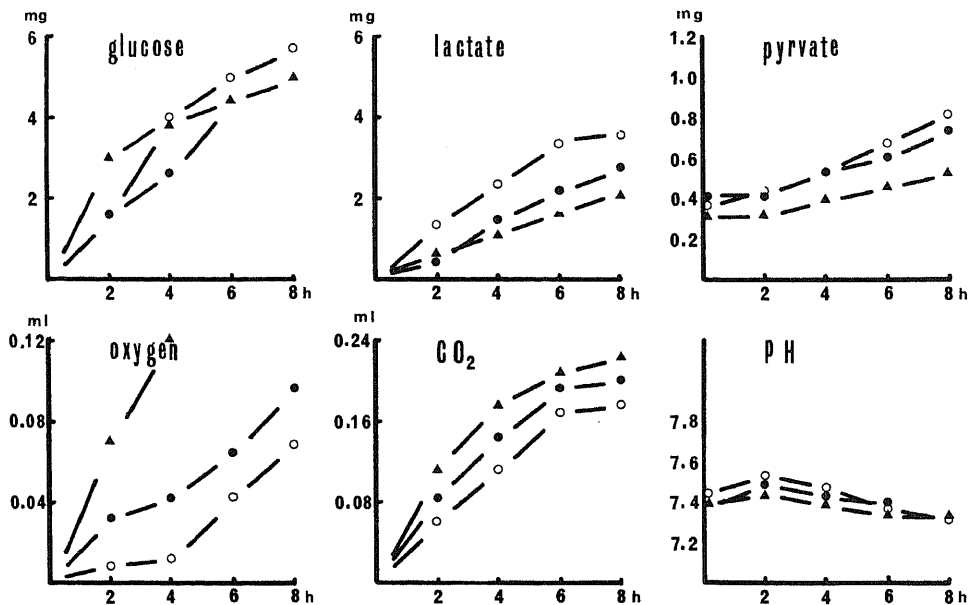


図3: チトクロムc 100mg/dl ( $7.7 \times 10^{-5}$  モル) 添加による代謝変化.

ビリルビン単独負荷の場合に比し, 乳酸産生量は減少し, 酸素消費量, 炭酸ガス産生量は増加し, pHの変動は減少する. 焦性ブドウ酸にも著明な変化はみられない.

▲チトクロムc添加群 ○ビリルビン負荷群 ●対照群

AMP 添加の場合 1.4mg/4 時間, 2.6mg/8 時間であった。焦性ブドウ酸はビリルビン負荷の場合 0.26mg%/直後, 0.64mg%/4 時間, 0.91mg%/8 時間であり, サイクリック AMP 添加の場合 0.28mg%/直後, 0.63mg%/4 時間, 0.96mg%/8 時間であった。酸素消費量はビリルビン負荷の場合 0.062 ml/4 時間, 0.093 ml/8 時間であり, サイクリック AMP を添加した場合は 0.038 ml/4 時間, 0.055 ml/8 時間であった。炭酸ガス産生量はビリルビン負荷の場合 0.114 ml/4 時間, 0.117 ml/8 時間であり, サイクリック AMP 添加の場合 0.07 ml/4 時間, 0.13 ml/8 時間であった。サイクリック AMP 添加の場合 pH の変動には, ビリルビン負荷の場合とは認むべき差異を生じなかった。

写真 9 はサイクリック AMP 添加 6 時間後の培養細胞である。細胞質内に空胞がわずかにみられる場合もあるが, 細胞突起の縮小はわずかであった。

#### 5) サルファ剤

図 6 は培養液にビリルビン負荷およびサルファ剤添加およびサルファ剤単独投与の影響を示す。糖消費量

はビリルビン単独負荷の場合 2.8mg/4 時間, 5.6mg/8 時間であり, サルファ剤添加の場合 4.8mg/4 時間, 5.6mg/8 時間であり, サルファ剤単独負荷の場合 3.2mg/4 時間, 5.0mg/8 時間であった。乳酸産生量はビリルビン単独負荷の場合 3.4mg/4 時間, 4.8mg/8 時間であり, サルファ剤添加の場合 3.6mg/4 時間, 5.6mg/8 時間であり, サルファ剤単独負荷の場合 1.8mg/4 時間, 5.6mg/8 時間であった。焦性ブドウ酸は各薬剤投与直後は 0.32mg%であったが, 8 時間後にはビリルビン単独負荷の場合 0.64mg%, サルファ剤添加の場合 0.6mg%, サルファ剤単独負荷の場合 0.68mg%であった。酸素消費量はビリルビン単独負荷の場合とサルファ剤単独負荷の場合同じ値を示し, 0.036 ml/4 時間, 0.050 ml/8 時間であり, ビリルビンにサルファ剤を添加した場合 0.072 ml/4 時間, 0.078 ml/8 時間であった。炭酸ガス産生量はビリルビン単独負荷の場合 0.104 ml/4 時間, 0.164 ml/8 時間であり, サルファ剤添加の場合 0.104 ml/4 時間, 0.154 ml/8 時間であり, サルファ剤単独負荷の場合 0.114 ml/4 時間, 0.215 ml/8 時

### EFFECTS OF ALBUMIN ON GLUCOSE METABOLISM BY BILIRUBIN

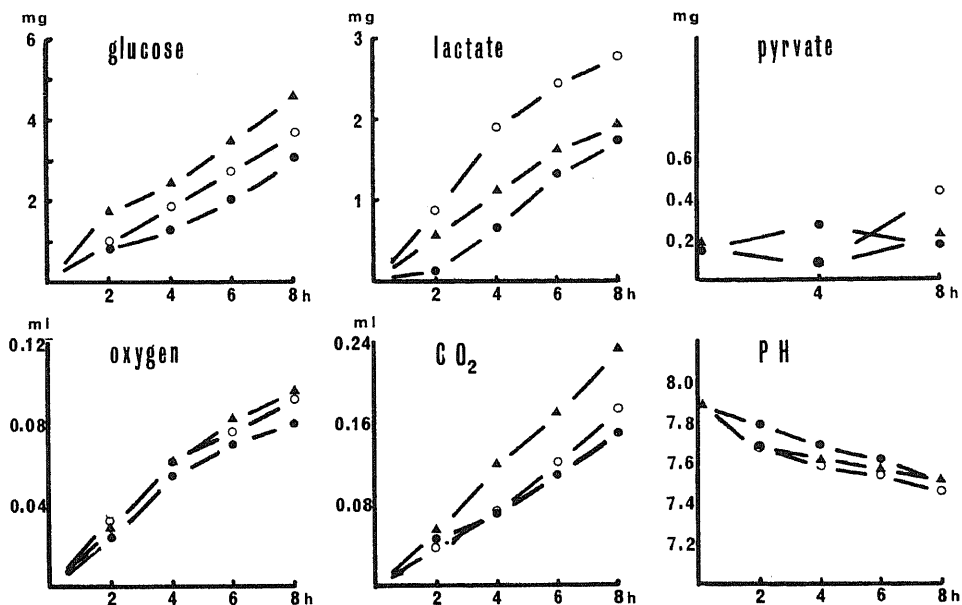


図 4: アルブミン 580.5mg/dl ( $3.42 \times 10^{-4}$  モル) 添加による代謝変化。

ビリルビン単独負荷の場合に比し, 乳酸産生量は減少し, 酸素消費量, 炭酸ガス産生量は増加し, pH の変動は減少する。

▲アルブミン添加群 ●対照群 ○ビリルビン負荷群

間であった。pHの変動は、サルファ剤単独負荷の場合に对照群と同じ傾向を示し、ビリルビン単独負荷の場合にやや増大し、サルファ剤添加の場合にさらに増大した。

写真10および11はサルファ剤添加6時間後の培養細胞である。細胞は丸くなり培養面よりはがれ、培養液中に浮遊するのが観察された。培養面に付着している細胞の細胞質内には空泡変性がみられた。

### 考 按

クモ膜下出血、脳内出血および脳室内出血の臨床像は、出血による直接機械的圧迫、あるいは脳の局在性損傷による症状よりも、むしろ二次的頭蓋内圧亢進<sup>22)~25)</sup>、脳偏位、脳血管攣縮<sup>26)</sup>、その他代謝障害<sup>27)</sup>などによる脳機能の障害によるものが大きい。一旦血管外に出た血液成分およびその分解産物は脳に対して物理的のみならず、化学的有害物質として作用する<sup>19)</sup>。Barrow<sup>8)</sup>によると髄液系内に出た血球は溶血し、まずオキシヘモグロビンが生じ、このものは2~3日で最高値に達し、その後、徐々に減少する。ビ

リルビンは出血後2~3日で出現し、約2~3週間髄液中に残存し、キサントクロミーの主成分となる。髄液系内出血後にみられる髄液中のビリルビンは血清中のビリルビンが浸入したものではなく、髄膜系の細胞により産出されるものと推定されていた<sup>18)</sup>。Roost<sup>28)</sup>らはin vitroで、髄液中にてヘモグロビンをIncubateしてもビリルビンは産出されないのに、生体の髄液系内に赤血球やヘモグロビンを注入すると、ビリルビンが産出され、同時に、クモ膜や脈絡膜におけるヘムオキシゲナーゼ活性の著明な上昇がみられることから、クモ膜や脈絡膜にビリルビン産生能があると主張した。ビリルビンには直接型ビリルビンと間接型ビリルビンがある。間接型ビリルビンは核黄疸の原因物質として研究されてきた<sup>10)~18)</sup>。クモ膜下腔に注入された間接型ビリルビンは、著明に頭蓋内圧を亢進させる<sup>9)</sup>。Jackson<sup>11)</sup>は、髄液系内出血の場合その予後は、髄液中のビリルビン量が多いほど悪いとした。

Ritis<sup>78)</sup>らは、子宮癌より採取したHela細胞を5~10%仔牛血清を添加した培地でビリルビン6mg/dlを負荷した結果、24時間後より細胞の空泡化ならび

### EFFECTS OF CYCLIC-AMP ON GLUCOSE METABOLISM BY BILIRUBIN

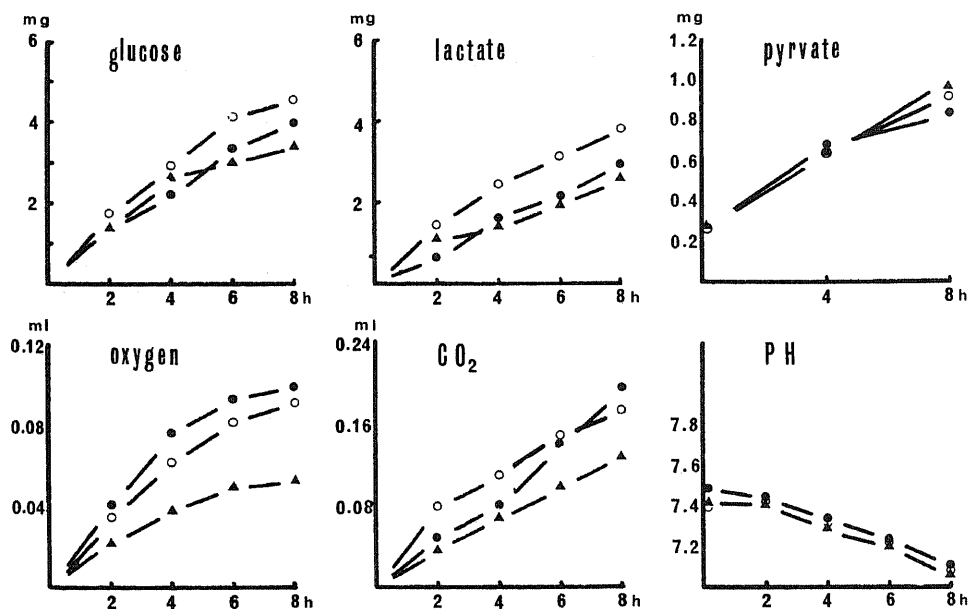


図5：サイクリックAMP 17.4mg/dl ( $3.42 \times 10^{-4}$  モル) 添加による代謝変化。

ビリルビン単独負荷の場合に比し、糖消費量、乳酸産生量、酸素消費量、炭酸ガス産生量はともに減少しているがpHの変動は類似する。

▲サイクリックAMP添加群 ○ビリルビン負荷群 ●对照群

に萎縮をみ、72時間後より細胞破壊をみた。Silberberg<sup>31)</sup>らはラット新生児の小脳をカバースリップ法で培養し、これにビリルビンやその他血液分解産物を負荷すると、ビリルビン5mg/dlの濃度で3~4時間後にニューロンの核は偏在化し、6時間後にはミエリン鞘の断裂、7~8時間後にはグリアの膨化をみ、これに対し、1mg/dlの濃度ではほとんど変化をみなかったとした。

本研究では、鶏胚脳培養細胞は、細胞によってその程度は異なるが、形を変えて、培養面を移動し、これにビリルビンを負荷すると、細胞の動きは少なくなり、2時間目頃より細胞突起の収縮と細胞質の空胞化がみられ、細胞質の空胞化は時間とともに増加するのがみられた。ビリルビン負荷群では、培養液の焦性ブドウ酸値には変化がなく、乳酸産生量の増加、酸素消費量の減少、炭酸ガス産生量の減少、pHの低下を来した。これらの事実は、ビリルビン負荷により嫌気性解糖が盛んとなり、好氣的代謝が低下することを示す<sup>21)</sup>。

ビリルビンはミトコンドリア膜のリン脂質と結合し、1) 酸化的リン酸化を障害し、2) 電子伝達系を抑制し、3) ミトコンドリア膜の透過性を変化させて、ミトコンドリアの腫脹を来す<sup>32)~38)</sup>。またビリルビンは可溶性酵素であるグルタミン酸脱水素酵素<sup>39)</sup>、リンゴ酸脱水素酵素、NADH脱水素酵素<sup>38)</sup>をも抑制し、呼吸に影響を与えない低濃度でも肝癌細胞のDNA合成を阻害する<sup>40)</sup>ことが知られている。従って、これらの細胞に対するビリルビンの有害作用の軽減は、1) ビリルビンの細胞内への侵入の抑制、あるいは2) 呼吸酵素を補給するなどの方法によって達成されることが考えられる。

ビリルビン負荷培養液にNADを添加すると、乳酸産生量、焦性ブドウ酸値が減少し、酸素消費量、炭酸ガス産生量が増加し、pHの変動が減少する事実は、ビリルビンによる嫌気性解糖の亢進、好気性代謝の低下を、NADが阻止しうることを示す。また培養細胞の形は、NADの添加により、なお、細胞突起の縮小はま

# EFFECTS OF HOMOSULFAMINE ON GLUCOSE METABOLISM BY BILIRUBIN

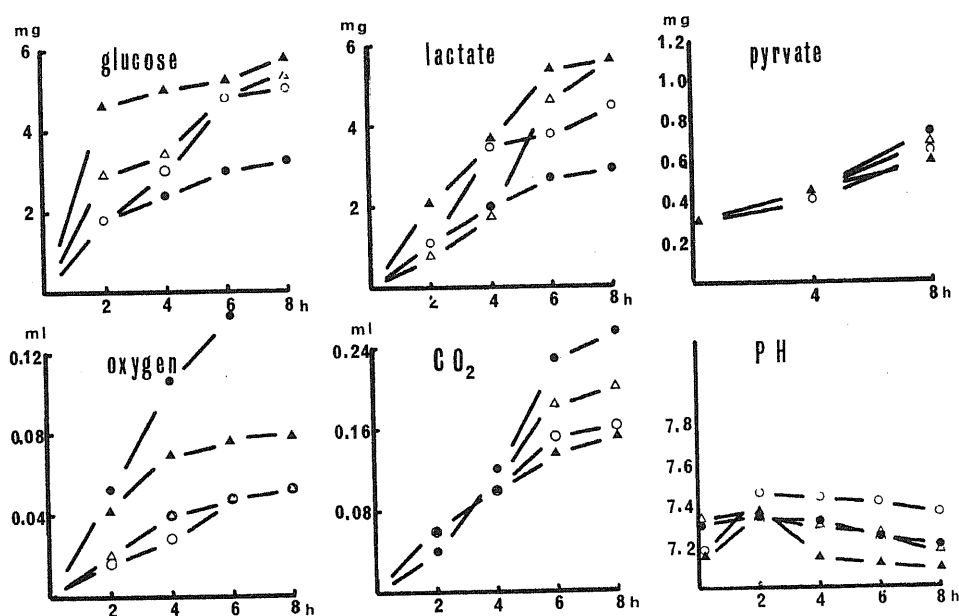


図6：ホモスルファミン8.0mg/dl ( $3.42 \times 10^{-4}$  モル) 添加による代謝変化。

ビリルビン単独負荷の場合に比し、糖消費量はやや増加し、乳酸産生量は増加し、炭酸ガス産生量は減少している。pHの変動は増大する。

▲ホモスルファミン添加群 △ホモスルファミン単独負荷群  
○ビリルビン負荷群 ●対照群

ぬがれないが、細胞質の空胞化はみられなかった。

NAD はニコチン酸アミドより形成されるヌクレオチドであり、一部はミトコンドリア膜に、大部分は可溶性部分に存在する<sup>41)</sup>。その働かしは酸化過程の脱水素作用であり、NAD の後にフラビン酵素系、チトクロム酵素系が参加し、水素は酸素と化合し水になる。NAD の前駆物質であるニコチン酸は、その欠乏により下肢の麻痺などの神経症状を来し、病理学的には大脳基底核、脊髄前角細胞等に病変が証明される<sup>42)43)44)</sup>。Cowger<sup>32)</sup> は、ビリルビンがミトコンドリア膜の  $\text{NADH}_2$  脱水素酵素活性を抑制することを発見した。Zetterstrom<sup>45)</sup> らはラットのミトコンドリアを使用して、ビリルビンによる呼吸抑制が NAD 投与によりみられなくなることを示した。

Zetterstrom<sup>45)</sup> らはラットのミトコンドリアで、Day<sup>46)</sup> はラットの脳細胞で、酸素消費量を測定してビリルビン (20 ~ 25mg/dl) による呼吸抑制を観察し、さらに  $10^{-4}$  モルのチトクロム c をビリルビンに添加することにより、ビリルビンによる呼吸抑制は阻止されることを観察した。さらに Day<sup>47)</sup> はチトクロム c がビリルビンの 1/5 量でもビリルビンによる呼吸抑制を改善することを観察した。その際チトクロム c によりビリルビンがビリベルジンに酸化されて、ビリルビンの細胞毒性作用は消失すると説明した。チトクロム c は分子量約 12000 ~ 13000 のヘム蛋白質で 1 分子あたり 1 個の鉄ポルフィリン核をもち、代謝的エネルギー転換機構の中で重要な位置を占めている<sup>74)</sup>。Day<sup>46)</sup> は、ラットの脳切片にチトクロム c を  $10^{-4}$  モル作用させて呼吸が 10 % 増加することを観察した。Proger<sup>49)</sup> らは、臨床的に酸素 10 % の状態でもチトクロム c を 60mg 投与しておけば心電図、脳波の変化は阻止できることを観察した。

チトクロム c をビリルビンの 1/4 量添加した場合は、ビリルビン単独投与の場合に比較して、酸素消費量、炭酸ガス産生量は増加、乳酸産生量は減少、焦性ブドウ酸も軽度減少、pH の変動は減少した。ビリルビンによってひき起こされた嫌気性解糖の亢進、好気性代謝の低下はチトクロム c の添加で阻止された。またビリルビン単独投与の場合にみられた培養細胞の突起の縮小、細胞質の空胞化はチトクロム c の添加で消失した。

ビリルビンとアルブミンは結合し<sup>50)~54)</sup>、ビリルビンの細胞に対する毒性はアルブミンによって軽減されることが知られ<sup>60)61)</sup>、臨床的には高ビリルビン血症の治療にアルブミンが用いられている<sup>52)~54)</sup>。鶏胚脳培養細胞ではビリルビン負荷に比較してアルブミンを添加し

た場合、乳酸産生量は減少、酸素消費量、炭酸ガス産生量は増加したが、焦性ブドウ酸は軽度減少して著明な変化はみられなかった。これはビリルビンによってひき起こされる嫌気性解糖の亢進、好気性代謝の低下がアルブミンによって阻止されることを示している。培養細胞の形態的变化では、アルブミン添加の場合は、ビリルビン単独負荷の場合にみられた細胞突起の縮小はみられたが、細胞質の空胞化はみられず、ほぼもとの形を保っているのが判明した。

ビリルビン単独負荷の場合に比して、サイクリック AMP を添加した場合、糖消費量、乳酸産生量は共に減少し、焦性ブドウ酸、pH は著明な変化を示さず、酸素消費量、炭酸ガス産生量は共に減少した。培養細胞の形は、サイクリック AMP 添加の場合、ビリルビン単独負荷の場合にみられた細胞突起の縮小をきたさず、細胞質の空胞化もわずかであり、その形を保った。

サイクリック AMP は、細胞内でアデニールシクラーゼによって ATP から作られ<sup>55)</sup>、特異的なサイクリックホスホジエステラーゼによって 5'AMP に水解される<sup>56)</sup>。両酵素はともに、動物組織にきわめて広く分布しているが、なかでも脳における活性が最も高い<sup>57)77)</sup>。サイクリック AMP の細胞内における第 1 次反応は蛋白キナーゼの活性化であり、その蛋白キナーゼは活性部分と蛋白部分からなり、両者が結合しているときには酵素活性を示さず、サイクリック AMP が調節部分に結合すると両者の結合が解け、活性部分の酵素作用が発現する<sup>58)59)</sup>。蛋白キナーゼはヒストンをリン酸化し<sup>58)</sup>、膜蛋白質をリン酸化して、膜透過性を変えるなどの効果を発揮する。Orloff<sup>62)</sup> はカエルの膀胱で、Tarui<sup>63)</sup> は牛の甲状腺を使って、サイクリック AMP により膜の透過性が変わる事を観察した。Breckenridge<sup>64)</sup> は、マウスの脳を使って、サイクリック AMP と Ca イオンとの間の関係をコントロールすることによって膜の性質を変えると発表している。ジブチリルサイクリック AMP および脳抽出液 (サイクリック AMP に類似する物質を含む) は、ラットの脳培養細胞の形態的分化を促進する<sup>65)66)</sup>。Hsie と Puck<sup>67)~69)</sup> は中国ハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞で、サイクリック AMP が逆形質転換現象を起こすことを証明し、癌細胞が正常細胞形になることを示した。ジブチリルサイクリック AMP による逆形質転換は形態的变化ばかりでなく、接触阻害の回復<sup>70)</sup>、糖、アミノ酸、ヌクレチオドなどの低分子物質の膜透過能の低下<sup>71)72)</sup>、細胞の運動性の低下などがみられ<sup>73)</sup>、ジブチリルサイクリック AMP により癌細胞のもつ恒久的諸性状はすべて、正常細胞のそれに変換する。サイクリック AMP によるビリルビ



ンの細胞毒性作用の軽減は、サイクリック AMP による膜透過性の変化によるものと考えられる。

Silbermann<sup>75)</sup>は臨床例で、Blanc<sup>76)</sup>は Gunn rat を用いた実験で、サルファ剤の添加でビリルビンによる核黄疸がより増強されることを報告している。Johnson<sup>77)</sup>はラットを用いた実験で、サルファ剤添加により核黄疸は増強するが、血清ビリルビン値は減少することを確認し、それはサルファ剤がビリルビンを細胞内に侵入することを促進するものと主張した。Odell は、サルファ剤による核黄疸の増強は、サルファ剤がビリルビンのアルブミンとの結合面に競合することによると主張した。Blanc は、サルファ剤は血管床よりビリルビンが他組織へ移動することを促進すると主張している。培養細胞を用いた本研究においては、サルファ剤添加によるビリルビンの嫌気性解糖亢進作用の増強、好気性代謝低下作用の増強をみたが、サルファ剤の単独投与も又細胞毒性作用を示すことより、両者の相加的有害作用の可能性を否定しえない。

#### 結 語

受精後 9～11 日目、培養期間 7 日の鶏胚脳培養細胞の培養液に、ビリルビン 20mg/dl ( $3.42 \times 10^{-4}$  モル) を作用させ、培養細胞に与える影響を検索した。さらに、1) ニコチンアミド アデニンジヌクレチド (NAD)、2) チトクロム c、3) アルブミン、4) サイクリック AMP、5) サルファ剤のおのおのをビリルビンと同時に投与して、それらの培養細胞に与える影響を検索した。

1. 鶏胚脳培養細胞の培養液にビリルビンを添加することにより、細胞の運動性が抑制され、突起の縮小ならびに胞体の空胞化を増し、嫌気性解糖は亢進する。

2. ビリルビン負荷の鶏胚脳培養細胞の培養液にアルブミン、NAD、あるいはチトクロム c の添加はビリルビンによる細胞の変化を抑制し、嫌気性解糖の亢進を抑制し、好気性代謝の低下を抑制した。またサイクリック AMP の添加はビリルビンによる細胞の変化を抑制し、嫌気性解糖の亢進を抑制したが、好気性代謝の低下を抑制しなかった。以上の添加物質のうち最も有効なものがチトクロム c であり、NAD、アルブミン、サイクリック AMP の順であった。ビリルビンに対するこれらの物質の拮抗作用は、アルブミンはビリルビンと結合することにより、NAD およびチトクロム c は呼吸促進作用やビリルビンを酸化することによるものであり、サイクリック AMP はビリルビンに対する膜透過性を変えることによると思われる。

3. ビリルビン負荷鶏胚脳培養細胞の培養液にサル

ファ剤を添加することにより細胞の円形化、突起の縮小ならびに胞体の空胞化は増強し、嫌気性解糖はさらに亢進した。この物質の有害作用増強の効果は、細胞にビリルビンの侵入を助長するためと思われる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った恩師山本信二郎教授に謹しんで深謝の意を捧げます。また終始ご親切なご助言をいただいた教室の伊藤治英講師、嶋田修美博士に心から感謝の意を表します。また本研究遂行に際しご協力を頂きました第 3 解剖学教室および脳神経外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Jackson, I. T. : Arch. Neurol. Psychiat., 62, 572 (1949).
- 2) 宮崎雄二・末松克美 : 脳神経外科, 3, 57 (1975).
- 3) Mihorai, T. H. : J. Neurosurg., 32, 390 (1970).
- 4) Adamus, J. E., & Prowirohardjo, S. : Neurology, 9, 561 (1959).
- 5) Kennedy, J. C., Johnson, & D. : Surg. Form, 15, 424 (1964).
- 6) Braham, J., & Wollman, M. : Acta. Neuropathologica, 4, 559 (1965).
- 7) Hughs, J. T., & Oppenheimer, D. R. : Acta. Neuropathologica, 13, 56 (1969).
- 8) Barrow, L., Hunter, F. F. & Banker, B. Q. : Brain, 78, 59 (1955).
- 9) 藤井博之 : 十全医学会雑誌, 86, 482 (1977).
- 10) Clairaux, A. E., Cole, P. G. & Lathe, G. H. : The Lancet, 265, 1226 (1953).
- 11) Goran, A. D. T., & Scott, J. N. : The Lancet, March 28, 611 (1953).
- 12) Water, W. J., Richard, P. A. & Ramson, H. H. : Pediatrics, 13, 319 (1954).
- 13) Crosse, V. M., Meyer, T. C. & Gerrad, J. W. : Arch. Dis. Childhood, 30, 501 (1955).
- 14) Meyer, T. C. : Arch. Dis. Childhood, 31, 75 (1956).
- 15) Harris, R. C., Lucy, S. F. & Malean, J. R. : Pediatrics, 21, 875 (1958).
- 16) Johnson, L., Sarminento, F., Blanc, W. & Day, R. : Am. J. Dis. Child., 97, 591 (1959).
- 17) Chen, H., Lien, I & Lu, T. : Am. J. Pathol., 46, 331 (1965).
- 18) Odell, G. B., Bruce, Storey, G. N. &

- Rosenberg, L. A. : J. Pediatrics, 76, 12 (1970).
- 19) Hsia, D. Y., Allen, F. H., Gellis, S. S. & Diamond, L. K. : The New England Journal of Medicine, 247, 668 (1952).
- 20) Lucy, J. E., Hibbard, E., Behrman, R. E., Esquinel, F. O., Gallard, & Winale, W. F. : Exp. Neurol., 9, 43 (1964).
- 21) 嶋田修美 : 十全医学会雑誌, 85, 596 (1976).
- 22) 山本信二郎・林 実・山本鉄郎 : 脳神経, 23, 259 (1971).
- 23) 山本信二郎・林 実 : 脳神経外傷, 3, 227 (1971).
- 24) 山本信二郎・林 実・藤井博之 : 脳神経外科, 4, 1125 (1976).
- 25) 林 実・丸川 忍・藤井博之・北野哲男・山本信二郎 : 脳神経, 27, 1007 (1975).
- 26) Allock, J. M., & Drake, C. G. : J. Neurosurg., 22, 21 (1965).
- 27) Granholm, L. : The Scand. J. Lab. Inst., 23, 361 (1969).
- 28) Roost, K. I., Primstne, N. R., Diamond, I. & Schmid, R. : Neurology, 22, 973 (1972).
- 29) Schenker, S., McCaudless, D. W. & Zollman, P. : J. Clin. Invest., 45, 1213 (1966).
- 30) Odell, G. B. : J. Clin. Invest., 38, 823 (1959).
- 31) Silberberg, D. H., & Schutta, H. S. : J. Neuropatho. Exp. Neurol., 26, 572 (1967).
- 32) Cowger, M. L., Igo, R. P. & Labee, R. F. : Biochemistry, 4, 2763 (1965).
- 33) Diamond, I., & Schmid, R. : J. Clin. Invest., 45, 678 (1965).
- 34) Mustafa, M. G., Cowger, M. L. & King, T. E. : J. Biol. Chem., 245, 1084 (1970).
- 35) Silberberg, D. H., Johnson, L. & Ritter, L. : J. Pediatrics, 77, 386 (1970).
- 36) Noir, B. A., Boveris, A., Deveira, A. M. G. & Stoppani, A. O. M. : FBES letters, 27, 270 (1972).
- 37) Mustafa, M. G., Cowger, M. L. & King, T. E. : J. Biol. Chem., 244, 6403 (1969).
- 38) Paradici, F., & Gradiciano, L. : Experientia, 29, 1376 (1973).
- 39) Yamaguchi, T. : J. Biochem., 68, 441 (1970).
- 40) Thaler, M. M. : Nature New Biology, 230, 218 (1971).
- 41) Jacobson, K. B., & Kaplan, N. O. : J. Biol. Chem., 226, 603 (1957).
- 42) Wolly, D. M. : J. Biol. Chem., 157, 455 (1945).
- 43) Hick, S. F. : Am. J. Patho., 31, 189 (1955).
- 44) Sternberg, S. S., & Philips, F. S. : Science, 127, 644 (1958).
- 45) Zetterstrom, R., & Ernster, L. : Nature, 178, 1335 (1956).
- 46) Day, R. L. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85, 261 (1954).
- 47) Day, R. L. : Pediatrics, 17, 925 (1956).
- 48) 山村雄一 : 新生化学, 第3版, 301頁, 東京, 南山堂, (1964).
- 49) Proger, S., & Dekantes, D. : J. Pediatrics, 29, 729 (1946).
- 50) Martin, N. H. : J. Amer. Chem. Soc., 71, 1230 (1949).
- 51) Cowger, M. L. : J. Pediatrics, 67, 951 (1966).
- 52) Odell, G. B., Cohen, S. N. & Gordes, E. H. : Pediatrics, 30, 613 (1962).
- 53) Water, W. J., & Porter, E. : Pediatrics, 33, 749 (1964).
- 54) Schmid, R., Diamond, I., Hammerker, L. & Gunderson, C. B. : Nature, 206 (1965).
- 55) Sutherland, E. W., Roll, T. W. & Menon, T. : J. Biol. Chem., 237, 1220 (1962).
- 56) Butscher, R. W., & Sutherland, E. W. : J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962).
- 57) 垣内史朗 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 14, 336 (1969).
- 58) 西塚泰美 : 最新医学, 27, 967 (昭和47年).
- 59) 大沢伸昭 : ホルモンと臨床, 22, 1007 (1974).
- 60) 宮本英七 : 代謝, 11, 1283 (1974).
- 61) Miyamoto, E., Kuo, J. F. & Greengart, P. : Science, 165, 63 (1969).
- 62) Orlof, J., & Handler, J. S. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 5, 63 (1961).
- 63) Tarui, S., Monaka, K., Ikura, Y. & Shima, K. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 13, 329 (1963).
- 64) Brckenridge, B. M., & Norman, J. H. : J. Neurochem., 12, 51 (1965).
- 65) Lim, R., Mitsunobu, K. & Li, W. P. K. : Exp. Cell. Res., 79, 243 (1973).

- 66) Sensenbrenner, M., Springer, N. Booher, J. & Mandel, P. : Neurobiology, 2, 49 (1972).
- 67) Hsie, W., & Puck, T. T. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 358 (1971).
- 68) Hsie, A. W., Jones, C. & Puck, T. T. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 1648 (1971).
- 69) Puck, T. T., Waldren, C. A. & Hsie, A. M. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 69, 1943 (1972).
- 70) Scheppard, J. R. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 1316 (1971).
- 71) Haushka, P. V., Everhart, L. P. & Robin, R. W. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 69, 3542 (1972).
- 72) Kram, R., Mamont, P. & Tomkins, G. M. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 70, 1432 (1973).
- 73) Johnson, G. S., Morgan, W. D. & Pastan, I. : Nature, 235, 54 (1972).
- 74) Johnson, G. S., Friedman, R. M. & Pastan, I. : Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 425 (1971).
- 75) Silvermann, W. A., Anderson, D. H., & Blanc, W. A. : Pediatrics, 18, 614 (1956).
- 76) Blanc, W. A., & Johnson, L. : J. Neuropathol. Exp. Neurol., 18, 165 (1959).
- 77) 垣内史朗 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 14, 336 (1969).
- 78) Ritis, F. D., Paradisi, F & Maio, G. : Path. Microbiol., 37, 3746 (1971).
- 79) Grosse, G., & Lindnr G. : Journal Fur Himforshung 12, 207 (1970).

### A b s t r a c t

This study is to evaluate agents which inhibit or exacerbate the toxicity of bilirubin on tissue culture of chick embryo brain. Albumin of 580.5mg/100ml, nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD) of 22.7mg/100ml, cytochrome C of 100mg/100ml, cyclic AMP of 17.4mg/100ml and homosulfamin of 8.0mg/100ml were administered on each monolayer culture flask with the bilirubin of 20mg/100ml ( $3.42 \times 10^{-4}$  Mole), which were observed for 8 hours.

Bilirubin influenced such cellular changes as contraction of cellular process, degenerative swelling of cytoplasm and decrease of cell movement. Albumin, NAD, cytochrome C, and cyclic AMP inhibited those changes, whereas homosulfamin exacerbated them. Alubumin, NAD, and cytochrome C also inhibited such biochemical changes in experimental medium as increase of lactic acid production, decrease of carbon dioxide production and acidosis by bilirubin, whereas homosulfamin exacerbated these biochemical changes. Cyclic AMP inhibited the increase of lactic acid production but did not inhibit the decrease of carbon dioxide production or acidosis.

The protecting effects of some agents upon the cell influenced by bilirubin were dependent on the combination of the substance with bilirubin, the acceleration of cell respiration, or the strengthening of cell membrane. On the other hand, the noxious effects of homosulfamine were likely to make bilirubin diffuse into the cell.



写真 1. 鶏胚脳. 培養 7 日目  
位相差顕微鏡  $\times 106$   
培養液交換直後の細胞を示す.

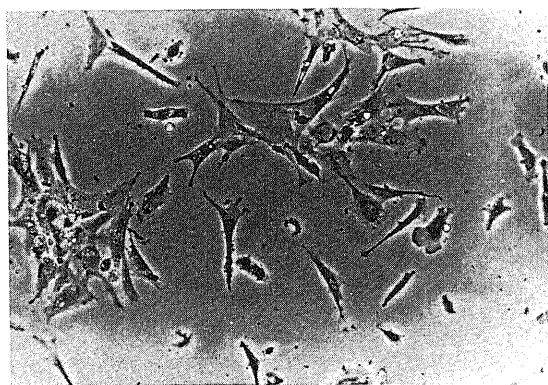


写真 2. 鶏胚脳. 培養 7 日目  
位相差顕微鏡  $\times 106$   
培養液交換 6 時間後の, 写真 1 と同一場所を示す.



写真 3. 鶏胚脳. 培養 8 日目  
位相差顕微鏡  $\times 106$   
ビリルビン負加直後の細胞を示す.

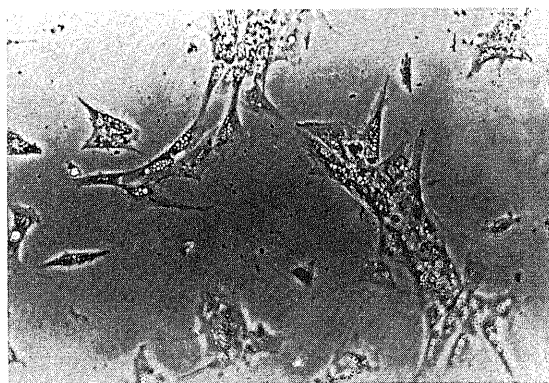


写真 4. 鶏胚脳. 培養 8 日目.  
位相差顕微鏡  $\times 106$   
ビリルビン負荷 6 時間後, 写真 3 と同一場所を示す. 細胞突起の縮少, 細胞質内に空胞がみられる.

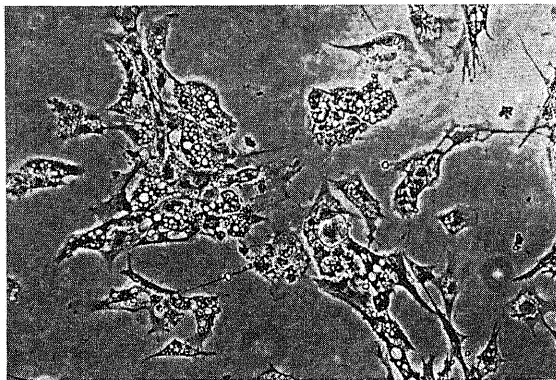


写真 5. 鶏胚脳. 培養 7 日目  
位相差顕微鏡  $\times 106$   
ビリルビン負加 6 時間後の細胞で, 細胞質内に空胞, 細胞突起の縮少がみられる.

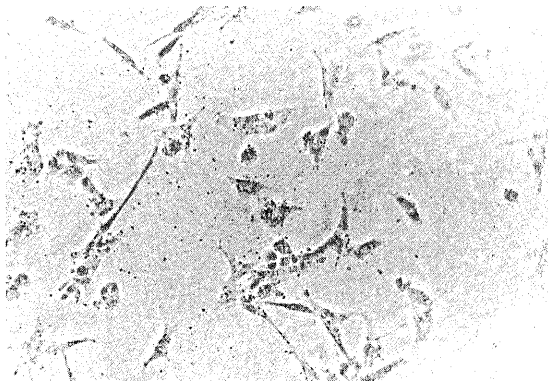


写真 6. 鶏胚脳. 培養 7 日目  
位相差顕微鏡  $\times 106$   
NAD 添加 6 時間後の細胞を示す. 細胞突起の縮少, 細胞質内の空胞などはほとんど認められない.

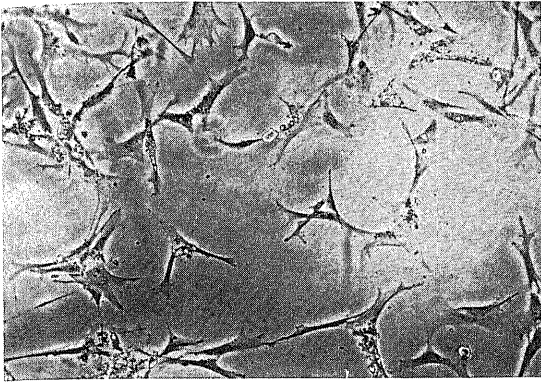


写真7. 鶏胚脳. 培養7日目  
位相差顕微鏡×106  
チトクロムc添加6時間後の細胞を示す. 細胞突起の縮少もみられず, 細胞質内の空胞も認められない.

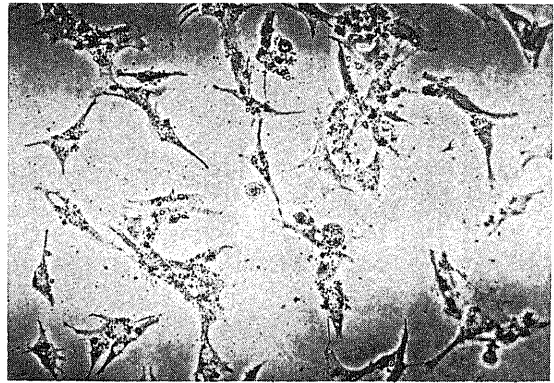


写真8. 鶏胚脳. 培養7日目  
位相差顕微鏡×106  
アルブミン添加6時間後の細胞を示す. 細胞突起の縮少, 細胞の円形化, 細胞質内空胞が, 一部に認められる.

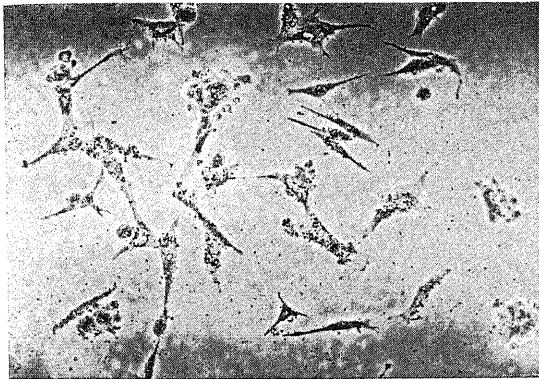


写真9. 鶏胚脳. 培養7日目  
位相差顕微鏡×106  
サイクリックAMP添加6時間後の細胞を示す. 細胞突起の縮少, 細胞の円形化, 細胞質内空胞がわずかに認められる.

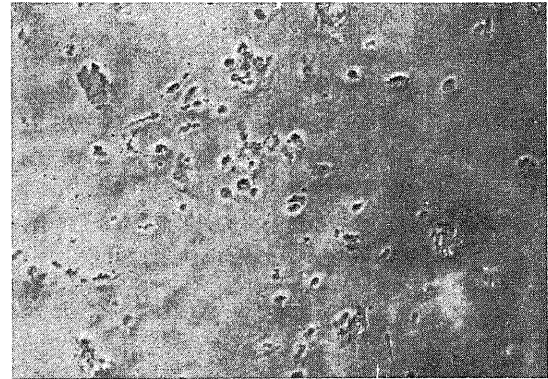


写真10. 鶏胚脳. 培養7日目  
位相差顕微鏡×106  
ホモスルファミン添加6時間後の細胞を示す. 細胞は円形化し, 培養面より浮遊するのが認められる.

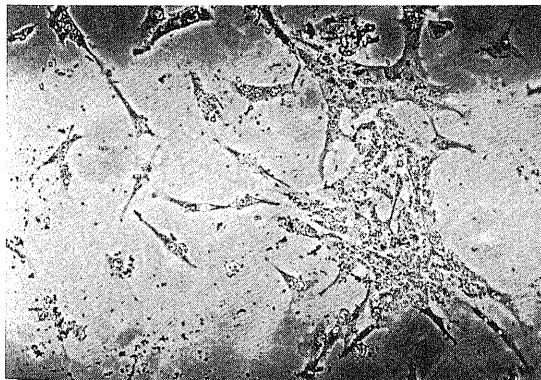


写真11. 鶏胚脳. 培養7日目  
位相差顕微鏡×106  
ホモスルファミン添加6時間後の細胞を示す. 培養面に付着した細胞で, 著明な細胞質内空胞が認められる.